

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 10127289 A

(43) Date of publication of application: 19 . 05 . 98

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/21
C12P 21/02
C12P 21/08
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
// A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 48/00
(C12N 1/21 , C12R 1:19), (C12P
21/02 , C12R 1:19)

(21) Application number: 08286823

(22) Date of filing: 29 . 10 . 96

(71) Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD

(72) Inventor: HINUMA KUNIJI
FUKUZUMI MASASHI
KAWAMATA YUJI

(54) NEW G PROTEIN CONJUGATE TYPE RECEPTOR COPYRIGHT: (C)1998,JPO
PROTEIN AND ITS DNA

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new protein comprising a human brain-derived G protein conjugate type receptor protein containing a specific amino acid sequence and used for development of medicines by screening of agonist or antagonist, preparation, etc., of antibody and antiserum.

SOLUTION: This new G protein conjugate type receptor protein (salt) derived from human brain contains a (substantially) same amino acid sequence as an amino acid sequence represented by the formula and the protein or DNA coding for the protein is useful for determination of ligand, acquisition of antibody and antiserum, construction of expression system of recombinant type receptor protein, development of receptor-bound assay system using the expression system, screening of medicine candidate, practice of drug design based on comparison to similar ligand and receptor, reagent for gene diagnosis and prevention and treatment for gene. The protein is obtained by synthesizing cDNA from human fetal brain poly(A)⁺RNA, cloning the cDNA with PCR and expressing the resultant gene in a host cell.

Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala .
1 5 10 15
Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg
20 25 30
Bis Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr
35 40 45
Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr
450 455 460
Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Thr Pro
465 470 475 480
Cys

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-127289

(43)公開日 平成10年(1998)5月19日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 N 15/09

C 07 H 21/04

C 07 K 14/705

16/28

C 12 N 1/21

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00

ZNAA

C 07 H 21/04

B

C 07 K 14/705

16/28

C 12 N 1/21

審査請求 未請求 請求項の数14 OL (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平8-286823

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ1402号

(72)発明者 福住 昌司

茨城県つくば市並木3丁目17番地6 ロイ

ヤルシティ並木302号

(72)発明者 川俣 裕二

茨城県つくば市松代4丁目22番地 松代4

丁目団地2-203号

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

(57)【要約】 (修正有)

【解決手段】ヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質又はその塩、それをコードするDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニング方法で得られる化合物又はその塩等。

【効果】ヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質又はそれをコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体及び抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断に於るプローブ、PCRプライマーの作成等に於る試薬、⑦遺伝子予防・治療剤等の医薬等として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項2】配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項3】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項4】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項5】配列番号：3で表される塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項6】配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項7】請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項8】請求項7記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項9】請求項8記載の形質転換体を培養し、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。

【請求項10】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項11】(i) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項12】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項13】請求項11記載のスクリーニング方法または請求項12記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レ

セプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項14】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に関する。

【0002】

【従来の技術】多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。例え

ば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないかった。脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag

(E S T) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのE S Tは配列情報のみからは、その機能を推定することは困難である。例えば、データベース：N C B I a b E S Tには、アセッションNo. T 0 8 0 9 9 (配列番号：5) およびNo. T 2 7 0 5 3 (配列番号：6) の2種類のE S Tが登録されているが、その機能については明らかにされていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するレセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニングにより得られるレセプターアゴニストまたはアンタゴニスト、該レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを含有する医薬、および該G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体などを提供する。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、公開されているデータベースに登録されている機能不明な2種類のE S T情報に基づいて、ヒト胎児脳由来およびヒト成人脳由来の2種類のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするc DNAを単離することに成功し、全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのc DNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(2) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(3) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(4) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(5) 配列番号：3で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、(6) 配列番号：4で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、

(7) 第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(8) 第(7)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(9) 第(8)項記載の形質転換体を培養し、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、

【0006】(10) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、(11) (i) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第

(3) 項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする方法、(12) 第

(1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(13) 第(1)項記載のスクリーニング方法または第(12)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および(14) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0007】より具体的には、(15) 蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(16) 蛋白質が、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

10個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上

(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(2)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(17) リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、パソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン(chemokine)(例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンである第(11)項記載のリガンドの決定方法、

【0008】(18)標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(19)標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩のスクリーニング方法、

(1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または

その塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(20)標識したリガンドを第

(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0009】(21)標識したリガンドを第(8)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(8)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)

項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(22)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(23)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(8)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

30 における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(24)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を第(8)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

40 【0010】(24)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物がアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グ

ルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンである第(22)項または第(23)項記載のスクリーニング方法、(25)第(11)項、第(18)項～第(24)項記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、(26)第(25)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

【0011】(27) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(12)項記載のスクリーニング用キット、

(28) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(12)項記載のスクリーニング用キット、(29)第(12)項、第(27)項または第(28)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、(30)第(29)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、および(31)第(14)項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする第(1)項または第(2)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(3)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の定量法を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質(以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある)は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列〔図1および図2〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質であり、さらには配列番

号：2で表わされるアミノ酸配列〔図4および図5〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質であってもよい。なお、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端側にさらに61アミノ酸が付加したものである。本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脇臓β細胞、骨髓細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髓、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するペプチドであってもよく、また合成ペプチドであってもよい。

【0013】配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、例えば、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などを有し、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質であれば何れのものも含まれる。実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。また、本発明のレセプター蛋白質としては、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミ

ノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。より具体的には、本発明のレセプター蛋白質としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト脳由来のレセプター蛋白質、または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが用いられる。

【0014】さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記したレセプター蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているものの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。さらに、本発明のレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）であり、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質をはじめとする本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COR）であつてもよい。ここでエステル基のRとしては、メチル、エチル、n-ブロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

【0015】本発明のレセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安

息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のレセプター蛋白質またはの塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0016】本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、【図3】で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、【図6】で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。具体的には、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第78番目～第130番目、第193番目～第204番目、第274番目～第307番目または第387番目～第398番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドや、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第139番目～第191番目、第254番目～第265番目、第335番目～第368番目または第448番目～第459番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドなどが用いられる。

【0017】さらに、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドには、上記した部分ペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているものの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。さらに、本発明の部分ペプチ

ドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であり、上記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、C末端がアミドまたはエステルであってもよい。また、本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。本発明の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0018】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによつても良い。すなわち、本発明部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0019】本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAラ

イブラー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。具体的には、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列またはそれとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質ペプチドと同一の活性、すなわち、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列と約70～80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0020】また、本発明の配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列またはそれとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質ペプチドと同一の活性、すなわち、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約70～80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。より具体的には、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：

4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：4で表わされる塩基配列は、配列番号：3で表わされる塩基配列の5'末端にさらに183塩基が付加した配列である。ハイブリダイズは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えばハイストリンジエントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約1

9～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が40

50 9～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が

約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

【0021】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse TranscriptasePolymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。具体的には、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列またはそれとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質ペプチドと同一の活性、すなわち、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAであれば何れのものでもよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列と約70～80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同意性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列の部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第78番目～第130番目、第193番目～第204番目、第274番目～第307番目または第387番目～第398番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列の第232番目～第390番目、第577番目～第612番目、第820番目～第921番目または第1159番目～第1194番目の塩基配列を有するDNAなど用いられる。

【0022】また、本発明の配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列またはそれとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質ペプチドと同一の活性、すなわち、リガンド結合活性、シグナル

ル情報伝達作用などを有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAであれば何れのものでもよい。ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約70～80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同意性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第139番目～第191番目、第254番目～第265番目、第335番目～第368番目または第448番目～第459番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列の第415番目～第573番目、第760番目～第795番目、第1003番目～第1104番目または第1342番目～第1377番目の塩基配列を有するDNAなど用いられる。ハイブリダイズは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えばハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

【0023】本発明のレセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプラマイマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutant™-G (宝酒造(株))、Mutant™-K (宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。また、配列番号：1で表わされる塩基配列は、配列番号：2で表わされる塩基配列の5'末端から183塩基を削除することにより製造することができる。クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを附加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、ま

た3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TG AまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0024】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキュロウイルスなどの動物ウイルスなど他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好み。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好み。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好み。

【0025】発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp'を略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子

(以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr)細胞を用いてDHR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によつても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエ

シェリヒア属菌である場合は、アルカリフィオスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクターα・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0026】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12·DH1〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエーパーリサーチ, (Nucleic Acids Research), 9卷, 309(1981)], JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120卷, 517(1978)], HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41卷, 459(1969)], C600〔ジェネティックス(Genetics), 39卷, 440(1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス(Bacillus subtilis) MI114〔ジーン, 24卷, 255(1983)], 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95卷, 87(1984)]などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

【0027】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(Bombyx mori N; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ(in Vitro), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315卷, 592(1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DH

F R 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (d h f r⁻CHO 細胞) , マウス L 細胞, マウス A t T - 20 , マウスミエローマ細胞, ラット GH3 , ヒト FL 細胞などが用いられる。

【0028】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジーズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 75巻, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、例えば、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0029】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や搅拌を加える

ことでもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や搅拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーカホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L.

ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 77巻, 4505 (1980) 】や0.5%カザミノ酸を含有するSD

10 培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 81巻, 5330 (1984) 】が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0030】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.

4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122巻, 501 (1952)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)] , 199培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や搅拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

30 40 【0031】上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと略記することがある。) などの界面活

性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0032】かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したりガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬、または⑦遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病的予防・治療剤などとして使用することができる。本発明のレセプター蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA、および抗体の用途について、以下により具体的に説明する。

【0033】(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを探索し、または決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、スマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブペプチドインテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、スマトスタチン、ドーパミン、モチリ

20 ン、アミリン、プラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなど）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0034】具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法としては、

40 50

【0034】(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを探索し、または決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ポンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、スマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブペプチドインテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、スマトスタチン、ドーパミン、モチリ

白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0035】より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0036】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、前記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば

何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267卷, 19555～19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

【0037】したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm～3000 rpm) で短時間 (通常、約1分～10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm～30000 rpm) で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画

分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0038】該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、パソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（パソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグラジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイドまたはガラニンなどが好適である。

【0039】具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性

剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチド、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～1.0mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドとして選択することができる。

【0040】本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0041】本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

40

50

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37°C、5%CO₂, 95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釀する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0042】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために非標識試験化合物を5 μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、臍臍などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、パソブレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTT H、VIP (パソアクティブ インテスティナル アンドリレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-

8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エシテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニンなどが用いられる。

【0043】(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の遺伝子予防・治療剤

10 上記(1)の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを本発明のレセプター蛋白質欠乏症の遺伝子予防・治療剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質欠乏症の遺伝子予防・治療剤などとして有用である。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA (以下、本発明のDNAと略記する場合がある) を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスゾシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた40 製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0044】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター、トライガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチ

エリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0045】また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性があるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0046】(3) 遺伝子診断剤

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAの異常（遺伝子異常）を検出することができる。したがって、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、該DNAの異常

を検出するための遺伝子診断剤として有用である。

【0047】(4) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

【0048】(5) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによつて、リガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）などが含まれる。すな

わち、本発明は、(i) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、

(i) 本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドと、リガンドを接触させた場合と(ii) 本発明の

レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドと、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合における、例えば、該レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0049】より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0050】④本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩と

の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質

10 転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法

20 を提供する。

【0051】本発明のレセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま

30 用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるレセプター蛋白質としては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質などが適している。

【0052】本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該レセプター蛋白質を

コードするDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質または部分ペプチドであってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0053】本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のによる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり 10^3 ~ 10^8 分子

であるのが好ましく、 10^5 ~ 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0054】リガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば [3 H]、 [125 I]、 [14 C]、 [35 S] などで標識されたリガンドなどが用いられる。具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4~10 (望ましくは pH 6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチシ、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~1.0 ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm~500000 cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} M~ 10^{-10} M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント (B_0) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ($B - NSB$) を100%とした時、特異的結合量 ($B - NSB$) が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0055】リガンドと本発明のレセプター蛋白質また

はその塩との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0056】リガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質またはその塩、本発明の部分ペプチドまたはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で維代し、37°C、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

10 【0057】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

② 10^{-3} ～ 10^{-10} Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式【数1】で求める。

【0058】

【数1】

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

30 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

【0059】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には本発明のレセプター蛋白質に結合し、該レセプター蛋白質を介して細胞刺激活性を発揮する化合物またはその塩（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、あるいは本発明のレセプター蛋白質に結合するが、該刺激活性を発揮しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用をしているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な

40 医薬組成物として有用である。逆に、本発明のレセプタ

50 医薬組成物として有用である。逆に、本発明のレセプタ

一蛋白質に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0060】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0061】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレンギリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性

であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症

10 状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0062】(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する

20 抗体または抗血清の製造

本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

30 (a) モノクロナール抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩（以下、レセプター蛋白質等と略記する場合がある）は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0063】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に

結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタイルの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレンギリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが用いられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが用いられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は約1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が約10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0064】抗レセプター蛋白質等抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗レセプター蛋白質等モノクローナル抗体を検出する方法や、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合した抗レセプター蛋白質等モノクローナル抗体を検出する方法などが用いられる。抗レセプター蛋白質等モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、HAT(ヒボキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常約20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常約5日~3週間、好ましくは約1週間~2週間である。培養は、通常約5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0065】(b) モノクローナル抗体の精製

抗レセプター蛋白質等モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿

法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、D EAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行ないことができる。以上の(1)および(2)の方法に従って製造させる本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

(i) 本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに対する抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質または標識化部分ペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質または標識化部分ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質またはその塩の定量法、(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質またはその塩の定量法において、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質のC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質またはその塩の定量法を提供する。

【0066】本発明のレセプター蛋白質等を認識するモノクローナル抗体(以下、抗レセプター抗体と称する場合がある)を用いて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a'b')₂、Fa'b'、あるいはFa'b'画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、レセプター蛋白質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、

[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリプロテアーゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵

素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンーアビジン系を用いることもできる。

【0067】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗レセプター蛋白質抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗レセプター蛋白質抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗レセプター蛋白質等に対する抗体はレセプター蛋白質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0068】本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量

の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

10 【0069】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「メソップ・イン・エンジモノジー（Methods in ENZYMOLOGY）」Vol. 70(Immunoch emical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunoch emical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunoch emical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunoch emical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Method s))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodie s))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照〕。以上のように、本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

40 【0070】DNA : デオキシリボ核酸
c DNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
m RNA : メッセンジャーリボ核酸

41

d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
d C T P	: デオキシチジン三リン酸
A T P	: アデノシン三リン酸
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
E I A	: エンザイムイムノアッセイ
G l y	: グリシン
A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
【0071】T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキ
サミド基	

【0072】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：2】本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端側に61個のアミノ酸がさらに付加したアミノ酸配列を示す。

【配列番号：3】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：4】配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列であり、配列番号：3で表わされる塩基配列の5'末端にさらに183

42

塩基が付加した配列を示す。

【配列番号：5】データベース(NCBI abEST)にアセッションNo.T08099として登録されているESTの塩基配列を示す。

【配列番号：6】データベース(NCBI abEST)にアセッションNo.T27053として登録されているESTの塩基配列を示す。

【0073】【配列番号：7】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：8】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：9】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：10】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：11】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：12】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【0074】【配列番号：13】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：14】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：15】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒアコリ(Escherichia coli)HB101/pHEBF2は、平成8年10月25日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5724として寄託されており、また平成8年10月21日から財团法人発酵研究所(IFO)にIFO 16044として寄託されている。

【0075】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0076】

【実施例1】ヒト poly(A)+RNAからのレセプター蛋白質の全翻訳領域のcDNAの取得と塩基配列の決定

(1) ヒト胎児脳 poly(A)+RNAからの3'RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によるレセプ

50

タ一蛋白質のC末端周辺の翻訳領域のcDNAの取得と塩基配列の決定

公知の塩基配列アセシションNo.T08099(配列番号:5)およびアセシションNo.T27053(配列番号:6)がコードするレセプター蛋白質のC末端周辺の翻訳領域のcDNAを取得するためにヒト胎児脳poly(A)’RNAを録型として、3’RACE法を行なった。まず最初に、上記の公知の塩基配列に基づいて、次の2つのプライマーを合成した。

B1：(配列番号:7)

5’-AAGTTGGCTGTCATCTGGGTGG
GCTC-3’

B2：(配列番号:8)

5’-TGAGCTCCTGCTGTGGCAGCTG
GCACAG-3’

次に、1μgのヒト胎児脳poly(A)’RNA(クローンテック社)を3’RACEキット(GIBCO BRL社)を用いて3’RACE法のPCR用の録型を作成した。次に、1回目のPCRを3’RACEキット付属のプライマーとB1プライマーを用いて、95℃・30秒、65℃・60秒、72℃・180秒を35回、Ex Taq(宝酒造(株))を用いて行なった。反応液のうち1μlをとり、さらにB1プライマーをB2プライマーに代えて同じ条件で35サイクル2回目のPCR反応を行なった。電気泳動後、生じた1.5kbの大きさのバンドを回収し、TAクローニングキット(インビトロゲン社)を用いてサブクローニングし、大腸菌JM109に導入した。その配列を解析した結果、増幅されたバンドは上に述べた公知の塩基配列のC末端領域を保持していることが明らかとなった。

【0077】(2)ヒト胎児脳poly(A)’RNAからの5’RACE法(マラソン法)によるレセプター蛋白質のN末端周辺の翻訳領域のcDNAの取得と塩基配列の決定

上記の公知の塩基配列がコードするレセプター蛋白質のN末端周辺の翻訳領域のcDNAを取得するためにヒト胎児脳poly(A)’RNAを録型として、5’RACE法を行なった。まず最初に、上記の公知の塩基配列に基づいて、次の2つのプライマーを合成した。

B8：(配列番号:9)

5’-CATGCGGGCGTTCTGGTAGGTC
ATCAC-3’

B9：(配列番号:10)

5’-GAAGAGGATGGGCAGGCAGAAG
TAGCAG-3’

次に、1μgのヒト胎児脳poly(A)’RNA(クローンテック社)をマラソンキット(クローンテック社)のマニュアルにしたがって5’RACE用のPCRの録型を作成した。次に、1回目のPCRをマラソンキット付属のプライマーとB9プライマーを用いて、98℃・10

秒、72℃・180秒、5回、98℃・10秒、70℃・180秒、5回、98℃・10秒、68℃・180秒、35回の反応をEx Taqを用いて行なった。さらに、反応液を50倍薄めたもの1μlを録型として2回目のPCRをB9プライマーをB8プライマーにかえて同一条件で反応を行なった。生じた約1kbのバンドを回収し、上記(1)と同様にTAクローニングキット(インビトロゲン社)を用いてサブクローニングし、塩基配列の解析を行なった。上記(1)および(2)の結果より、【図1および図2】に示す625番目のATG(Me t)から2067番目のTGC(Cys)までの塩基配列(配列番号:3)にコードされる481アミノ酸(配列番号:1)からなる7回膜貫通のレセプター蛋白質の存在が確認された。このアミノ酸配列に基づいて疎水性プロットを行なった結果を【図3】に示す。

【0078】(3)上記のレセプター蛋白質のN末端側をさらに調べ、転写開始コドンを決定するために5’側でさらに5’RACE法を行なった。上記(2)で得られたレセプター蛋白質の翻訳領域の配列に基づいて以下の2つのプライマーを合成した。

B11：(配列番号:11)

5’-ATGAAGGGCACGGCACGACAAG
AAACG-3’

B12：(配列番号:12)

5’-ATGACAATAGGGAGGCAGAAAA
AGAGG-3’

次に、上記(2)で用いたヒト胎児脳poly(A)’RNA(クローンテック社)あるいはヒト小脳poly(A)’RNA(ニッポンジーン社)を用いて、上記(2)と同様に

30 PCR用の録型を作成した。次に、2度のPCRをそれぞれB9の代わりにB11を、B8の代わりにB12のプライマーを用いて同様に上に述べた2つの臓器のpoly(A)’RNA由来の録型を増幅した。反応産物を電気泳動した後、生じたバンドを回収し、TAクローニング後解析した。その結果、上記(1)～(3)を合わせて得られた配列は、【図4および図5】に示す442番目のATG(Me t)から2067番目のTGC(Cys)までの塩基配列(配列番号:4)を有しており、542アミノ酸(配列番号:2)からなる7回膜貫通のレセプ40 ター蛋白質をコードしていることが確認された。このアミノ酸配列に基づいて疎水性プロットを行なった結果を【図6】に示す。

【0079】この配列に基づき以下のプライマーを合成した。

HEF：(配列番号:13)

5’-GTCGACGAGATGTGTGAGGGCA
GCAAAGAGTGC-3’

HER-1：(配列番号:14)

5’-TACTGGGGCCTCAGCAAGGTGT
GCCAG-3’

これら2種類の合成プライマーを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーよりPCR法にて増幅し、大腸菌にサブクローニング後、PCRエラーのないクローンを選択し、大腸菌HB101に形質転換して、形質転換体・大腸菌HB101/pHEBF2を得た。プラスミドpHEBF2に保持されるDNAは、配列番号：4〔図4および図5〕で表わされる塩基配列を有しており、その中には配列番号：3〔図1および図2〕で表わされる塩基配列が含まれている。また、上記の2種類のプライマーで95℃・30秒、68℃・90秒の条件で増幅した時には胎児脳からはPCR法にて〔図4および図5〕に示すレセプター蛋白質のcDNAを取得できた。次に、成人脳からも該レセプターのcDNAを取得するためには、HEFのプライマーの代わりにHEF-2のプライマーを合成した。

HEF-2：(配列番号：15)

5'-GTCGACTGGCTGTCTCCTGCTCATCCAGCCAT-3'

このHEF-2とHER-1のプライマーを用いて、成人脳poly(A)+RNAを増幅したところ、〔図1および図2〕に示すレセプター蛋白質をコードするcDNAが取得できた。このレセプター蛋白質はN末端が〔図4および図5〕に示したレセプター蛋白質より61アミノ酸短いものであった。〔図1および図2〕に示したレセプター蛋白質の翻訳開始コドンの直前には、コザックの配列と呼ばれる翻訳開始を示すコンセンサス配列があり、またN末端部にはっきりとしたシグナル配列がある。これらの結果から、成人脳では〔図1および図2〕に示されるレセプター蛋白質が主として発現されていることがわかる。一方、胎児脳からは〔図4および図5〕に示されるレセプター蛋白質をコードするcDNAが得られており、〔図4および図5〕に示した長い型のレセプター＊

配列

Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala			
1	5	10	15
Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg			
20	25	30	
His Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr			
35	40	45	
Glu Asp Glu Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr Val Pro Glu Glu Trp			
50	55	60	
Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly Leu Gln Pro Thr Lys			
65	70	75	80
Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys Asp Gly Gly Thr Pro			
85	90	95	
Asp Ser Gly Gln Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr Gly Ala Pro Gly Gln			
100	105	110	
Arg Leu Gln Ile Gln Asn Pro Leu Tyr Pro Val Thr Glu Ser Ser Tyr			
115	120	125	
Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val Val Phe Ala Val Gly			

* 蛋白質の存在も確認された。

【0080】

【実施例2】各組織における発現特異性の確認

実施例1で取得したプラスミドpHEBF2に保持される本発明のレセプター蛋白質をコードするcDNAをプロープとしてノーザンプロットを行なった。cDNAのラベルはアマシャムのマルチプライムキットと [³²P]-dCTPを用いてキットマニュアル通りに行なった。また、ハイブリダイゼーションは、human MTN

10 Biot (クローンテック社) を用いて添付マニュアル通りに行ない、フィルターを-80℃で1週間露光させた。〔図7〕に示すように、このレセプター蛋白質mRNAは脳に特異的に発現していることが明らかとなつた。

【0081】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬、⑦遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

【0082】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：481

20 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：ペプチド

47

48

130	135	140
Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val Trp His Ser Tyr Tyr		
145	150	155
Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ala Leu Trp Asp		
165	170	175
Phe Leu Val Leu Phe Phe Cys Leu Pro Ile Val Ile Phe Asn Glu Ile		
180	185	190
Thr Lys Gln Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys Arg Ala Val Pro Phe		
195	200	205
Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe Ser Leu Cys Ala Leu		
210	215	220
Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr Leu Pro Lys Val Arg		
225	230	235
Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys Leu Ala Val Ile Trp		
245	250	255
Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Leu Trp Gln Leu		
260	265	270
Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met		
275	280	285
Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Val Met Thr		
290	295	300
Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Trp Tyr Phe Gly Cys Tyr Phe Cys Leu		
305	310	315
Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val Thr Trp Arg Val Arg		
325	330	335
Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala Ser Lys His Glu Gln		
340	345	350
Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly Leu Thr Val Val Tyr		
355	360	365
Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn Ile Val Val Ala Tyr		
370	375	380
Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp Leu Leu Gly Leu Ile		
385	390	395
Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile Thr Pro Val Leu Leu		
405	410	415
Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe Leu Asp Cys Cys Cys		
420	425	430
Cys Cys Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ala		
435	440	445
Asn Gly Ser Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr		
450	455	460
Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Thr Pro		
465	470	475
Cys		480

【0083】

【配列番号：2】

配列の長さ：542

配列

Met Cys Pro Ala Glu Gly Pro Ala Arg Pro Val Ala Gly Gly Trp Glu		
1	5	10
		15

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

49		50
Gly Gly Gln Ala Ser Asp Ala Arg Arg Leu Thr Gly Gly Ser Ser		
20	25	30
Arg Pro Ala Ala Ser Leu Glu Pro Ser Ser Trp Ala Pro Cys Thr His		
35	40	45
Leu Leu Phe Leu Gly Trp Leu Ser Pro Ala His Pro Ala Met Arg Trp		
50	55	60
Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala Val Gly Leu		
65	70	75
Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg His Arg Ala		
85	90	95
Glu Thr Gln Glu Gln Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr Glu Asp Glu		
100	105	110
Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr Val Pro Glu Glu Trp Ala Glu Tyr		
115	120	125
Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly Leu Gln Pro Thr Lys Pro Leu Val		
130	135	140
Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ser Gly		
145	150	155
Gln Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr Gly Ala Pro Gly Gln Arg Leu Gln		
165	170	175
Ile Gln Asn Pro Leu Tyr Pro Val Thr Glu Ser Ser Tyr Ser Ala Tyr		
180	185	190
Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val Val Phe Ala Val Gly Ile Val Gly		
195	200	205
Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val Trp His Ser Tyr Tyr Leu Lys Ser		
210	215	220
Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ala Leu Trp Asp Phe Leu. Val		
225	230	235
Leu Phe Phe Cys Leu Pro Ile Val Ile Phe Asn Glu Ile Thr Lys Gln		
245	250	255
Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys Arg Ala Val Pro Phe Met Glu Val		
260	265	270
Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe Ser Leu Cys Ala Leu Gly Ile Asp		
275	280	285
Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr Leu Pro Lys Val Arg Pro Ile Glu		
290	295	300
Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys Leu Ala Val Ile Trp Val Gly Ser		
305	310	315
Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Leu Trp Gln Leu Ala Gln Glu		
325	330	335
Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met Lys Pro Ser		
340	345	350
Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Val Met Thr Tyr Gln Asn		
355	360	365
Ala Arg Met Trp Trp Tyr Phe Gly Cys Tyr Phe Cys Leu Pro Ile Leu		
370	375	380
Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val Thr Trp Arg Val Arg Gly Pro Pro		
385	390	395
Gly Arg Lys Ser Glu Cys Arg Ala Ser Lys His Glu Gln Cys Glu Ser		
405	410	415

51

52

Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly Leu Thr Val Val Tyr Ala Phe Cys
 420 425 430
 Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn Ile Val Val Ala Tyr Leu Ser Thr
 435 440 445
 Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp Leu Leu Gly Leu Ile Asn Gln Phe
 450 455 460
 Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile Thr Pro Val Leu Leu Leu Cys Ile
 465 470 475 480
 Cys Arg Pro Leu Gly Gln Ala Phe Leu Asp Cys Cys Cys Cys Cys Cys
 485 490 495
 Cys Glu Glu Cys Gly Gly Ala Ser Glu Ala Ser Ala Ala Asn Gly Ser
 500 505 510
 Asp Asn Lys Leu Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr Phe His Lys
 515 520 525
 Pro Arg Glu Ser Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Thr Pro Cys
 530 535 540

【0084】

【配列番号：3】

配列の長さ：1443

配列の型：核酸

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*20

配列

ATCGGGTGGC TGTGGCCCT GGCTGTCCT CTTGCTGTGA TTTTGGCTGT GGGGCTAAC 60
 AGGGTCTCTG GGGGTGCCCT CCTGCACCTG GGCAGGCACA GAGCCGAGAC CCAGGAGCAG 120
 CAGAGCCGAT CCAAGAGGG CACCGAGGAT GAGGAGGCCA AGGGCGTCA GCAGTATGTG 180
 CCTGAGGAGT GGGCGGAGTA CCCCGGCCCT ATTCAACCTG CTGGCCTGCA GCCAACCAAG 240
 CCCTTGGTGG CCACCAGCCC TAACCCGAC AAGGATGGGG GCACCCAGA CAGTGGCAG 300
 GAACTGAGGG GCAATCTGAC AGGGGCACCA GGGCAGAGGC TACAGATCCA GAACCCCTG 360
 TATCCGGTGA CCGAGAGCTC CTACAGTGCC TATGCCATCA TGCTTCTGGC GCTGGTGGTG 420
 TTTGCGGTGG GCATTGTGGG CAACCTGTGCG GTCATGTGCA TCGTGTGGCA CAGCTACTAC 480
 CTGAAGAGCG CCTGGAACTC CATCCTTGCC AGCCTGGCCC TCTGGATTT TCTGGTCCTC 540
 TTTTCTGCC TCCCTATTGT CATCTTCAAC GAGATCACCA AGCAGAGGCT ACTGGGTGAC 600
 GTTTCTTGTC GTGCCGTGCC CTTCATGGAG GTCTCCTCTC TGGGAGTCAC GACTTCAGC 660
 CTCTGTGCC CGGGCATTGCA CCGCTTCCAC GTGGCCACCA GCACCCGTGCC CAAGGTGAGG 720
 CCCATCGAGC GGTGCAATC CATCCTGGCC AAGTTGGCTG TCATCTGGGT GGGCTCCATG 780
 ACGCTGGCTG TGCCCTGAGCT CCTGCTGTGG CAGCTGGCAC AGGAGCCTGC CCCCACCATG 840
 GGCACCCCTGG ACTCATGCAT CATGAAACCC TCAGCCAGCC TGCCCGAGTC CCTGTATTCA 900
 CTGGTGATGA CCTACCAGAA CGCCCGCATG TGGTGGTACT TTGGCTGCTA CTTCTGCCCTG 960
 CCCATCCTCT TCACAGTCAC CTGCCAGCTG GTGACATGGC GGGTGCAGGG CCCTCCAGGG 1020
 AGGAAGTCAG AGTGCAGGGC CAGCAAGCAC GAGCAGTGTG AGAGCCAGCT CAACAGCACC 1080
 GTGGTGGGCC TGACCGTGGT CTACGCCCTC TGCACCCCTC CAGAGAACGT CTGCAACATC 1140
 GTGGTGGCCT ACCTCTCCAC CGAGCTGACC CGCCAGACCC TGGACCTCCT GGGCCTCATC 1200
 AACCAAGTTCT CCACCTTCTT CAAGGGGCC ATCACCCAG TGCTGCTCCT TTGCATCTGC 1260
 AGGCCGCTGG GCCAGGCCTT CCTGGACTGC TGCTGCTGCT GCTGCTGTGA GGAGTGCAGGC 1320
 GGGGCTTCGG AGGCCTCTGC TGCCAATGGG TCGGACAACA AGCTCAAGAC CGAGGTGTCC 1380
 TCTTCCATCT ACTTCCACAA GCCCAGGGAG TCACCCCCAC TCCTGCCCCCT GGGCACACCT 1440
 TGC 1443

【0085】

【配列番号：4】

配列の長さ：1626

配列の型：核酸

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

※50

配列

ATGTGTCCAG	CAGAGGGCCC	TGCCCGGCCT	GTGGCCGGAG	GCTGGGAGGG	AGGGCAGGCG	60
AGTGATGCCA	GACGCCTGAC	TGGAGGCAGA	TCCAGCCGGC	CAGCTGCCTC	TCTGGAGCCC	120
AGCTCTGGG	CCCCCTGTAC	TCACCTGCTC	TTCCCTGGCT	GGCTGTCTCC	TGCTCATCCA	180
GCCATGCGGT	GGCTGTGCC	CCTGGCTGTC	TCTCTGCTG	TGATTTTGGC	TGTGGGGCTA	240
AGCAGGGTCT	CTGGGGGTGC	CCCCCTGCAC	CTGGGCAGGC	ACAGAGCCGA	GACCCAGGAG	300
CAGCAGAGCC	GATCCAAGAG	GGGCACCGAG	GATGAGGAGG	CCAAGGGCGT	GCAGCACTAT	360
GTGCCTGAGG	ACTGGGCGGA	GTACCCCCGG	CCCATTACCC	CTGCTGGCCT	GCAGCCAACC	420
AAGCCCTTGG	TGGCCACCAAG	CCCTAACCCC	GACAAGGATG	GGGGCACCCCC	AGACAGTGGG	480
CAGGAACCTGA	GGGGCAATCT	GACAGGGCA	CCAGGGCAGA	GGCTACAGAT	CCAGAACCCC	540
CTGTATCCGG	TGACCGAGAG	CTCCTACAGT	GCCTATGCCA	TCATGCTTCT	GGCGCTGGTG	600
GTGTTTGCAG	TGGGCATTGT	GGGCAACCTG	TCGGTCATGT	GCATCGTGTG	GCACAGCTAC	660
TACCTGAAGA	GCGCCTGGAA	CTCCATCCTT	GCCAGCCTGG	CCCTCTGGGA	TTTTCTGGTC	720
CTCTTTTCT	CCCTCCCTAT	TGTCATCTTC	AACGAGATCA	CCAAGCAGAG	GCTACTGGGT	780
GACGTTTCTT	GTCTGTGGT	GCCCTTCATG	GAGGTCTCCT	CTCTGGGAGT	CACGACTTTC	840
AGCCTCTGTG	CCCTGGGCAT	TGACCGCTTC	CACGTGGCCA	CCAGCACCCCT	GCCCAAGGTG	900
AGGCCCATCG	AGCGGTGCCA	ATCCATCCTG	GCCAACTTGG	CTGTCATCTG	GGTGGGCTCC	960
ATGACGCTGG	CTGTGCCCTGA	GCTCCTGCTG	TGGCAGCTGG	CACAGGAGCC	TGCCCCCACC	1020
ATGGGCACCC	TGGACTCATG	CATCATGAAA	CCCTCAGCCA	GCCTGCCCGA	GTCCCTGTAT	1080
TCACTGGTGA	TGACCTACCA	GAACGCCCGC	ATGTGGTGGT	ACTTGGCTG	CTACTTCTGC	1140
CTGCCCACATCC	TCTTCACAGT	CACCTGCCAG	CTGGTACAT	GGGGGGTGGC	AGGCCCCTCCA	1200
GGGAGGAAGT	CAGAGTGCAG	GGCCAGCAAG	CACGAGCAGT	GTGAGAGCCA	GCTAACACGC	1260
ACCGTGGTGG	GCCTGACCGT	GGTCTACGCC	TTCTGCACCC	TCCCAGAGAA	CGTCTGCAAC	1320
ATCGTGGTGG	CCTACCTCTC	CACCGAGCTG	ACCCGCCAGA	CCCTGGACCT	CCTGGGCCTC	1380
ATCAACCCAGT	TCTCCACCTT	CTTCAAGGGC	GCCATCACCC	CAGTGTGTG	CCTTTGCATC	1440
TGCAGGCCGC	TGGGCCAGGC	CTTCCCTGGAC	TGCTGTGCT	GCTGCTGCTG	TGAGGAGTGC	1500
GGCGGGGCTT	CGGAGGCCTC	TGCTGCCAAT	GGGTGGACA	ACAAGCTAA	GACCGAGGTG	1560
TCCTCTTCCA	TCTACTTCCA	CAAGCCCAGG	GAGTCACCCCC	CACTCCTGCC	CCTGGGCACA	1620
CCTTGC						1626

【0086】

【配列番号：5】

配列の長さ：426

配列の型：核酸

* 鎮の数：二本鎮

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c DNA

配列

TGCAATCCAT	CCTGGCCAAG	TTGGCTGTCA	TCTGGGTGGG	CTCCATGACG	CTGGCTGTGC	60
CTGAGCTCCT	GCTGTGGCAG	CTGGCACAGG	AGCCTGCCCC	CACCATGGGC	ACCCCTGGACT	120
CATGCATCAT	GAAACCCCTCA	GCCAGCCTGC	CCGAGTCCT	GTATTCACTG	GTGATGACCT	180
ACCAGAACGC	CCGCATGTGG	TGGTACTTTG	GCTGCTACTT	CTGCTGCC	ATCCCTTTCA	240
CAGTCACCTG	CCAGCTGGT	ACATGGGGGG	TGCGAGGCC	TCCAGGGAGG	AAGTCAGAGT	300
GCAGGGCCAG	CAAGCACGAG	CAGTGTGAGA	GCCAGCTAA	CAGCACCGTG	GTGGGCCTGA	360
CCGTGGTCTA	CGGCTTTTG	CAACCTTCCA	GAGAACGTTT	GCAACATCGT	GGTGGGCTTA	420
CCTTTT						426

【0087】

【配列番号：6】

配列の長さ：248

配列の型：核酸

* 鎮の数：二本鎮

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c DNA

※

配列

AACAAGGGCC	GTGGTCTACG	NCTTCTGCCAC	CCTCCCANAG	AACGTCTGCA	ACATCGTGGT	60
GGCCTACCTC	TCCACCGAGC	TGACCCGCCA	GNCCCTGGAC	CTCCTGGCC	TCATCAACCA	120
GTCTCTCCACC	TTCTTCAGG	GGCCCATCAC	CCCAGTGCTG	CTCCTTGCA	TCTGCAGGCC	180

55

GCTGGGCCAG GCCTTCCTGG ACTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGTNAGGAGT GCGGCGGGGC 240
TTCGGAGG 248

【0088】

【配列番号：7】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGTTGGCTG TCATCTGGGT GGGCTC 26

【0089】

【配列番号：8】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGAGCTCTG CTGTGGCAGC TGGCACAG 28

【0090】

【配列番号：9】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGCGGGCG TTCTGGTAGG TCATCAC 27

【0091】

【配列番号：10】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAGAGGATG GGCAGGCAGA AGTAGCAG 28

【0092】

【配列番号：11】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAAGGGCA CGGCACGACA AGAAACG 27

【0093】

【配列番号：12】

配列の長さ：27

* 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGACAATAG GGAGGCAGAA AAAGAGG 27

【0094】

10 【配列番号：13】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACGAGA TGTGTGAGGG CAG
CAAAGAG TGC 33

【0095】

20 【配列番号：14】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TACTGGGCC TCAGCAAGGT GTG
CCCAG 28

【0096】

30 【配列番号：15】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACTGGC TGTCTCCTGC TCATCCAGCC AT 32

【0097】

【図面の簡単な説明】

40 【図1】実施例1で得られた本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質(短型)をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

【図2】実施例1で得られた本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質(短型)をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。図1の続きである。

【図3】図1および図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター

* 50 蛋白質(短型)の疎水性プロットを示す。1~7で示し

た部分は疎水性ドメインを示す。

【図4】実施例1で得られた本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質(長型)をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

【図5】実施例1で得られた本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質(長型)をコードするDNAの塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。図1の続きである。

【図6】図4および図5に示したアミノ酸配列をもとに作成した、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質(長型)の疎水性プロットを示す。1~7で示した部分は疎水性ドメインを示す。

【図7】本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするmRNAのヒトの各組織における発現量をノザンハイブリダイゼーションで調べた結果を示 *

*す。Heartは心臓を、Brainは脳を、Placentaは胎盤を、Lungは肺を、Liverは肝臓を、Skeletal Muscleは骨格筋を、Kidneyは腎臓を、Pancreasは胰臓を、Spleenは脾臓を、Thymusは胸腺を、Prostateは前立腺を、Testisは精巣を、Uterusは子宮、Small Intestineは小腸を、Colonは大腸を、Peripheral Blood Leukocyteは末梢血球を、Cerebellumは小脳を、Cerebral Cortexは大脳皮質を、Medullaは延髄を、Occipital Poleは後頭葉を、Frontal Lobeは前頭葉を、Temporal Lobeは側頭葉を、Putamenは被殻を、Spinal Cordは脊髄を、Amygdalaは扁頭核を、Caudate Nucleusは尾状核を、Corpus Callosumは脳梁を、Hippocampus海馬を、Whole Brainは全脳を、Substantia Nigraは黒質を、Substantia Nigraは視床下核を、Thalamusは視床を示す。左側の数字(kb)はRNA分子量マーカーの大きさを示す。

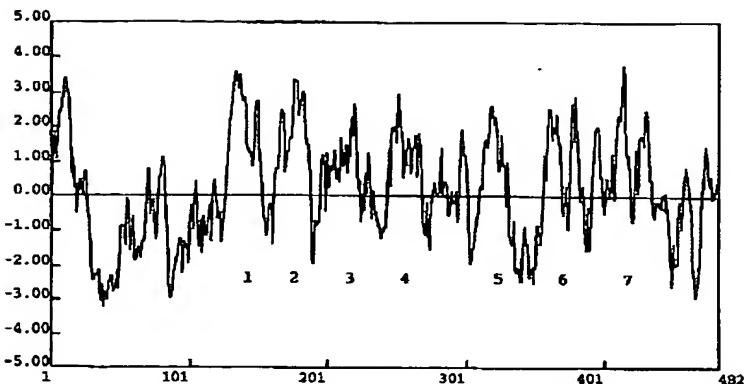
【図2】

1381	GCTGTCATCTGGGTGGGCTCCATGACCGCTGGCTGTGCCTGAGCTCCTGCTGTGGCAGCTG	1440
252	AlaValIleTrpValGlySerMetThrLeuAlaValProGluLeuLeuLeuTrpGlnLeu	272
1441	GCACAGGAGCCTGCCCTACCCTGGGACTCATGCATCATGAAACCCCTCAGCC	1500
272	AlaGlnGluProAlaProThrMetGlyThrLeuAspSerCysIleMetLysProSerAla	292
1501	AGCCTGCCCGAGTCCCTGTATTCACTGGTGATGACCTACCAGAACGCCGCATGTGGTGG	1560
292	SerLeuProGluSerLeuTyrSerLeuValMetThrTyrGlnAsnAlaArgMetTrpTrp	312
1561	TACTTGGCTGCTACTCTGCCTGCCATCCTCTTCACAGTCACCTGCCAGCTGGTGACA	1620
312	TyrPheGlyCysTyrPheCysLeuProIleLeuPheThrValThrCysGlnLeuValThr	332
1621	TGGCGGGTGCAGGGCCCTCCAGGGAGGAAGTCAGAGTGCAGGGCCAGCAAGCAGCAG	1680
332	TrpArgValArgGlyProProGlyArgLysSerGluCysArgAlaSerLysHisGluGln	352
1681	TGTGAGAGGCCAGCTAACAGCACCGTGGTGGCCCTGACCGTGCTACGCCCTCTGCACC	1740
352	CysGluSerGlnLeuAsnSerThrValValGlyLeuThrValValTyrAlaPheCysThr	372
1741	CTCCCAGAGAACGTCGCAACATCGTGGTGGCCCTACCTCTCCACCGAGCTGACCCGCCAG	1800
372	LeuProGluAsnValCysAsnIleValValAlaTyrLeuSerThrGluLeuThrArgGln	392
1801	ACCCTGGACCTCCTGGGCCTCATCAACCAGTTCTCCACCTTCTCAAGGGGCCATCAC	1860
392	ThrLeuAspLeuLeuGlyLeuIleAsnGlnPheSerThrPhePheLysGlyAlaIleThr	412
1861	CCAGTGCCTGCTCTTGCATCTGCAGGCCGCTGGGCCAGGCCCTTGACTGCTGCTGC	1920
412	ProValLeuLeuLeuCysIleCysArgProLeuGlyGlnAlaPheLeuAspCysCysCys	432
1921	TGCTGCTGCTGTGAGGAGTGCGGGGGGCTTCGGAGGGCTCTGCTGCCAATGGGTGGAC	1980
432	CysCysCysGluGluCysGlyGlyAlaSerGluAlaSerAlaAlaAsnGlySerAsp	452
1981	AACAAGCTCAAGACCGAGGTGTCCTCTCCATCTACTTCCACAAGGCCAGGGAGTCACCC	2040
452	AsnLysLeuLysThrGluValSerSerIleTyrPheHisLysProArgGluSerPro	472
2041	CCACTCCTGCCCTGGGCACACCTTGCTGAGGCCAGCTA	2080
472	ProLeuLeuProLeuGlyThrProCys***	482

【図1】

1	ATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGGGCAGGTCTCTGGAGTCAGA	60
1		1
61	TCTGGGTTGTGGGCCTGCTCTGCCMTGTATCAACTATGTGGCAAGTGACTGACCTCTAC	120
1		1
121	AAACCTCAGATTGTGATCTGAGATTAAATCAAGGGTAATTGAGAAACCAGCTGAGTGCT	180
1		1
181	AGCACCTAGTAAGTGTTCAGTAAGTGACAGTGACCGTTATGCCAGTCTTGAAATGGAGG	240
1		1
241	AGCTGCCCTAGAACATCAGGAGACCTGGCCCCAGTCCCATCTGCCAACCTCCCTGTGT	300
1		1
301	CACCCCTAGGCAGGCCACATTGCCCTAGTTCAAGGGCCTGAAGCAGATGCCCTCTTA	360
1		1
361	GGGCCCCACAGCCTGACATGCTGTAGGGCTGAGAACGGCGTCGGAGGACGAGATGT	420
1		1
421	GTGAGGGCAGCAAAGAGTGCTATGTGTCCAGCAGAGGGCCCTGCCGGCTGTGGCCGGA	480
1		1
481	GGCTGGGAGGGAGGGCAGGCAGTGATGCCAGCCCTGACTGGAGGGGATCCAGCCGG	540
1		1
541	CCAGCTGCCCTCTGGAGCCCAGCTTGGGCCCTGTACTCACCTGCTTCCCTGGGC	600
1		1
601	TGGCTGTCTCCCTGCTCATCCAGCCATGCCGTGGCTGTGGCCCCCTGGCTGTCTCTTGCT	660
1	MetArgTrpLeuTrpProLeuAlaValSerLeuAla	12
661	GTGATTTGGCTGTGGGCTAACGAGGGCTCTGGGGGTGCCCTGACCTGGCAGG	720
12	ValIleLeuAlaValGlyLeuSerArgValSerGlyGlyAlaProLeuHisLeuGlyArg	32
721	CACAGAGCCGAGACCCAGGAGCAGCAGACCCGATCCAAGAGGGCACCAGGGATGAGGAG	780
32	HisArgAlaGluThrGlnGluGlnGlnSerArgSerLysArgGlyThrGluAspGluGlu	52
781	GCCAAAGGCCCTGCAGCAGCTATGTGCCTGACGAGTGGGGAGTACCCCGGCCATTAC	840
52	AlaLysGlyValGlnGlnTyrValProGluLeuTrpAlaGluTyrProArgProIleHis	72
841	CCTGCTGCCCTGCAGCCAACCAAGCCCTGGTGGCCACCAGCCCTAACCCGACAAGGAT	900
72	ProAlaGlyLeuGlnProThrLysProLeuValAlaThrSerProAsnProAspLysAsp	92
901	GGGGCCACCCAGACAGTGGCAGGAACCTGAGGCCAACATGACAGGGCACCACCGCAG	960
92	GlyGlyThrProAspSerGlyGlnGluLeuArgGlyAsnLeuThrGlyAlaProGlyGln	112
961	AGGCTACAGATCCAGAACCCCTGTATCCGGTGACCGAGAGCTCTACAGTGCCCTATGCC	1020
112	ArgLeuGlnIleGlnAsnProLeuTyrProValThrGluSerSerTyrSerAlaTyrAla	132
1021	ATCATGCTCTGGCGCTGGTGGTTTGGCTGGCATTGTGGCAACCTGTCGGTCATG	1080
132	IleMetLeuLeuAlaLeuValValPheAlaValGlyIleValGlyAsnLeuSerValMet	152
1081	TGCATCGTGGCACAGCTACTACCTGAAAGAGCCCTGGAACTCCATCTGCCAGCCTG	1140
152	CysIleValTrpHisSerTyrTyrLeuLysSerAlaTrpAsnSerIleLeuAlaSerLeu	172
1141	GCCCTCTGGATTTCCTGGCTCTCTGCCCTATGTCATCTCAACGAGATC	1200
172	AlaLeuTrpAspPheLeuValLeuPhePheCysLeuProIleValIlePheAsnGluIle	192
1201	ACCAAGCAGGGCTACTGGTGACGTTCTGTGCGTGGCTCATGGAGGTCTCC	1260
192	ThrLysGlnArgLeuLeuGlyAspValSerCysArgAlaValProPheMetGluValSer	212
1261	TCTCTGGGAGTCACGACTTTCAGCCTCTGTGCCCTGGCCATTGACCGCTTCCACGTGGCC	1320
212	SerLeuGlyValThrThrPheSerLeuCysAlaLeuGlyIleAspArgPheHisValAla	232
1321	ACCAGCACCCGCCAAGGTGAGGCCCATGGAGGGTGCCAAATCCATCTGGCCAAGTTG	1380
232	ThrSerThrLeuProLysValArgProIleGluArgCysGlnSerIleLeuAlaLysLeu	252

【図3】



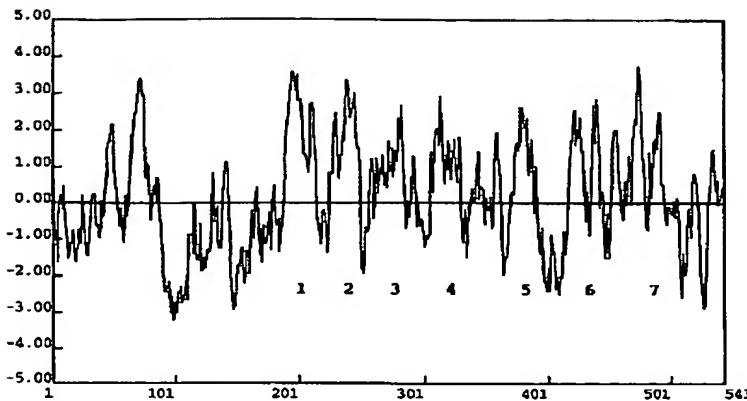
【図5】

1381	GCTGTCATCTGGGTGGGCTCCATGACGCTGGCTGTGCCTGAGCTCCCTGCTGTGGCAGCTG	1440
313	AlaValIleTrpValGlySerMetThrLeuAlaValProGluLeuLeuLeuTrpGlnLeu	333
1441	GCACAGGAGCCTGCCCAACCATGGGCACCCCTGGACTCATGCATCATGAAACCCCTCAGCC	1500
333	AlaGlnGluProAlaProThrMetGlyThrLeuAspSerCysIleMetLysProSerAla	353
1501	AGCCTGCCCGAGTCCCTGTATTCACTGGTGATGACCTACCAGAACGCCGCATGTGGTGG	1560
353	SerLeuProGluSerLeuTyrSerLeuValMetThrTyrGlnAsnAlaArgMetTrpTrp	373
1561	TACTTTGGCTGCTACTTCTGCCCTGCCCATCCTCTTCACAGTCACCTGCCAGCTGGTGACA	1620
373	TyrPheGlyCysTyrPheCysLeuProIleLeuPheThrValThrCysGlnLeuValThr	393
1621	TGGCGGGTGGCGAGGCCCTCCAGGGAGGAAGTCAGAGTCAGGTGCAGGCCAGCAAGCAAGGAGCAG	1680
393	TrpArgValArgGlyProProGlyArgLysSerGluCysArgAlaSerLysHisGluGln	413
1681	TGTGAGAGGCCAGCTCAACAGCACCGTGTTGGGCCTGACCGTGCTACGCCCTCTGCACC	1740
413	CysGluSerGlnLeuAsnSerThrValValGlyLeuThrValTyrAlaPheCysThr	433
1741	CTCCCAGAGAACGTCGTCAACATCGTGTTGGCCTACCTCTCCACCGAGCTGACCCGCCAG	1800
433	LeuProGluAsnValCysAsnIleValValAlaTyrLeuSerThrGluLeuThrArgGln	453
1801	ACCCTGGACCTCTGGGCCTCATCAACCAAGTTCTCACCTTCTCAAGGGGCCATCACC	1860
453	ThrLeuAspLeuLeuGlyLeuIleAsnGlnPheSerThrPhePheLysGlyAlaIleThr	473
1861	CCAGTGTGCTCCTTGCATCTGCGAGGCCGCTGGGCCAGGCCCTCCTGGACTGCTGCTG	1920
473	ProValLeuLeuCysIleCysArgProLeuGlyGlnAlaPheLeuAspCysCysCys	493
1921	TGCTGCTGCTGTGAGGAGTGCAGGGGGCTTGGAGGGCTCTGCTGCCAATGGGTCGGAC	1980
493	CysCysCysCysGluGluCysGlyAlaSerGluAlaSerAlaAsnGlySerAsp	513
1981	AACAAGCTCAAGACCGAGGTGTCCCTCTCCATCTACTTCCACAAGCCCAGGGAGTCACCC	2040
513	AsnLysLeuLysThrGluValSerSerIleTyrPheHisLysProArgGluSerPro	533
2041	CCACTOCTGCCOCTGGGCACACCTTGCTGAGGGCCCCAGTA	2080
533	ProLeuLeuProLeuGlyThrProCys***	543

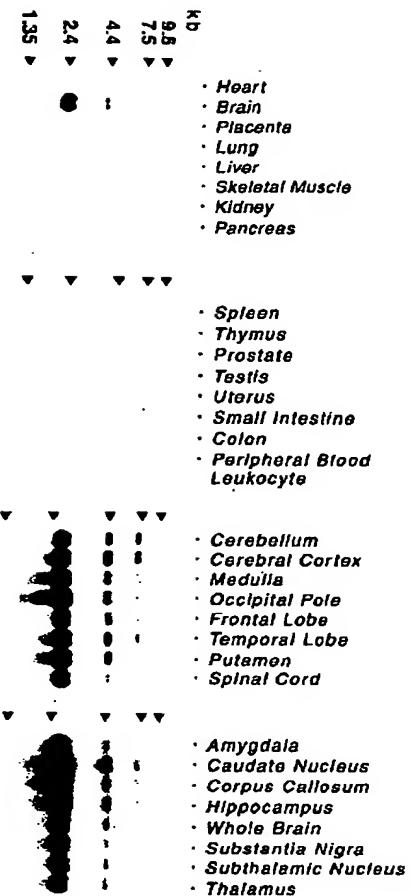
【図4】

1	ATCCTAATACGACTCACTATA	AGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGCAGCTCTGGACTCAGA	60
1			1
61	TCTGGGTTGTGGGCCTGCTCTGCCTTGATCAACTATG	TGGCAAGTGACTGACCTCTAC	120
1			1
121	AAACCTCAGATTGTGATCTGAGATTAA	TCAAGGGTTAATIGAGAAACCAGCTGAGTGCT	180
1			1
181	AGCACCTAGTAAGTGTTCAGTAAGTGACAGTGACGGTTATTG	GCTGAGTCTTGAATGGAGG	240
1			1
241	AGCTGCCTTAGAACATCAGGAGACCTGCGCCCCAGT	TCCCATTCTGCCCCACCTCCCTGTGT	300
1			1
301	CACCTAGGCAGGCCACATTTCCTCCCTAGTTTCAGGGCCTG	AAGCAGATGCCCTTTA	360
1			1
361	GGGCCCCACAGCCTGACATGCTGTAGGGCTGAGAAGCGGCGTCGTGGAGGACGAGATGT		420
1			1
421	GTGAGGGCAGCAAAGACTGCTATGTGTCCAGCAGAGGGCCCTG	CCCCGGCTGTGGCCGGA	480
1	MetCysProAlaGluGlyProAlaArgProValAlaGly		13
481	GGCTGGGAGGGAGCCAGGCGAGTGATGCCAGACCCCTGACT	TGGAGGCAGGATCAGCCGG	540
13	GlyTrpGluGlyGlyGlnAlaSerAspAlaArgLeuThrGlyGlyGlySerSerArg		33
541	CCAGCTGCCCTCTGGAGCCCCAGCTCTGGGCCCCCTGT	FACTCACCTGCTCTCCTGGGC	600
33	ProAlaAlaSerLeuCluProSerSerTrpAlaProCysThrHisLeuLeuPheLeuGly		53
601	TGGCTGTCTCCCTGCTCATCCAGCCATGCGGTGGCTGTGGCC	CCCTGGCTCTCTCTTGCT	660
53	TrpLeuSerProAlaHisProAlaMetArgTrpLeuTrpProLeuAlaValSerLeuAla		73
661	GTGATTTGGCTGTGGGCTAACGAGGGTCTCTGGGGT	GCCCCCTGCACCTGGCAGG	720
73	ValIleLeuAlaValGlyLeuSerArgValSerGlyGlyAlaProLeuHisLeuGlyArg		93
721	CACAGAGCCGAGACCCAGGAGCAGCAGAGCCGATCCAAG	AGGGGCACCGAGGATGAGGAG	780
93	HisArgAlaGluThrGlnGlnGlnSerArgSerLysArgGlyThrGluAspGluGlu		113
781	GCCAAGGGCGTGCAAGCAGTATGTGCC	TGAGGAGTGGCGGGAGTACCCCCGGCCATTAC	840
113	AlaLysGlyValGlnGlnTyrValProGluGluTrpAlaGluTyrProArgProIleHis		133
841	CCTGCTGGCCTGCAGCCAACCAAGCCCTGGTGCCGACCAC	CCCTAACCCGACAAGGAT	900
133	ProAlaGlyLeuGlnProThrLysProLeuValAlaThrSerProAsnProAspLysAsp		153
901	GGGGCACCCCCAGACAGTGGGACCGAAACTGAGCCCCAATCTG	ACAGGGGCACCAAGGGCAG	960
153	GlyGlyThrProAspSerGlyGlnGluLeuArgGlyAsnLeuThrGlyAlaProGlyGln		173
961	AGGCTACAGATCCAGAACCCCCCTGTATCCGGTGACCGAGAGCTCTACAGTGCTATGCC		1020
173	ArgLeuGlnIleGlnAsnProLeuTyrProValThrGluSerSerTyrSerAlaTyrAla		193
1021	ATCATGCTCTGGGCGTGGTGTTGCGGTGGCATTGTGGCAACCTGTCGGTCATG		1080
193	IleMetLeuAlaLeuValValPheAlaValGlyIleValGlyAsnLeuSerValMet		213
1081	TGCATCGTGTGGCACAGCTACTACCTGAAGAGGCCCTGGA	ACTCCATCCTTGCCAGGCC	1140
213	CysIleValTrpHisSerTyrTyrLeuLysSerAlaTrpAsnSerIleLeuAlaSerLeu		233
1141	GCCCTCTGGGATTTCTGGCTCTTCTGCTCCCTATTGT	CATCTTCACAGGAGATC	1200
233	AlaLeuTrpAspPheLeuValLeuPhePheCysLeuProIlePheAsnGluIle		253
1201	ACCAAGCAGAGGGTACTGGTGACCTTCTCTGCGTGCCCTTC	CATGGAGGTCTCC	1260
253	ThrLysGlnArgLeuLeuGlyAspValSerCysArgAlaValProPheMetGluValSer		273
1261	TCTCTGGGAGTCACGACTTTCAGCCTCTGTGCCCTGGCATTG	ACCGCTTCCACGTGGCC	1320
273	SerLeuGlyValThrThrPheSerLeuCysAlaLeuGlyIleAspArgPheHisValAla		293
1321	ACCAGCACCCCTGCCAACGGTGAGGCCATCGAGCGGTG	CCAAGTGTGGCC	1380
293	ThrSerThrLeuProLysValArgProIleGluArgCysGlnSerIleLeuAlaLysLeu		313

【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号
C 1 2 P	21/02
	21/08
C 1 2 Q	1/68
G O 1 N	33/53
	33/566
// A 6 1 K	38/00
	39/395
	48/00
(C 1 2 N	1/21
C 1 2 R	1:19)
(C 1 2 P	21/02
C 1 2 R	1:19)

F I		
C 1 2 P	21/02	C
	21/08	
C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N	33/53	D
	33/566	
A 6 1 K	39/395	N
		D
	48/00	ADS
	37/02	

BEST AVAILABLE COPY